

4/5/3

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI  
(c) 2001 Derwent Info Ltd All rts. reserv.

009240301

WPI Acc No: 1992-367719/199245

XRAM Acc No: C92-163297

Strong transcriptional promoter from Kluyveromyces lactis - provides efficient expression of heterologous proteins e.g. human serum albumin in yeast

Patent Assignee: RHONE POULENC RORER SA (RHON ); RHONE-POULENC RORER SA (RHON )

Inventor: FLEER R; FOURNIER A; MAYAUX J; YEH P

Number of Countries: 026 Number of Patents: 016

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 511912	A1	19921104	EP 92401206	A	19920428	199245 B
WO 9219751	A1	19921112	WO 92FR375	A	19920428	199248
FR 2676070	A1	19921106	FR 915294	A	19910430	199301
ZA 9203083	A	19930127	ZA 923083	A	19920428	199310
AU 9217892	A	19921221	AU 9217892	A	19920428	199311
			WO 92FR375	A	19920428	
NZ 242543	A	19931026	NZ 242543	A	19920429	199345
FI 9304806	A	19931029	WO 92FR375	A	19920428	199402
			FI 934806	A	19931029	
NO 9303654	A	19931011	WO 92FR375	A	19920428	199404
			NO 933654	A	19931011	
EP 584166	A1	19940302	EP 92910339	A	19920428	199409
			WO 92FR375	A	19920428	
JP 6506602	W	19940728	JP 92510457	A	19920428	199434
			WO 92FR375	A	19920428	
HU 67448	T	19950428	WO 92FR375	A	19920428	199523
			HU 933087	A	19920428	
AU 658630	B	19950427	AU 9217892	A	19920428	199525
US 5646012	A	19970708	WO 92FR375	A	19920428	199733
			US 93140093	A	19931101	
			US 95483639	A	19950607	
EP 584166	B1	19980325	EP 92910339	A	19920428	199816
			WO 92FR375	A	19920428	
DE 69224902	E	19980430	DE 624902	A	19920428	199823
			EP 92910339	A	19920428	
			WO 92FR375	A	19920428	
ES 2113948	T3	19980516	EP 92910339	A	19920428	199826

Priority Applications (No Type Date): FR 915294 A 19910430

Cited Patents: 3.Jnl.Ref; EP 361991

Patent Details:

Patent No Kind Lan Pg Main IPC Filing Notes

EP 511912 A1 F 22 C12N-015/81

Designated States (Regional): PT

WO 9219751 A1 F 27 C12N-015/81

Designated States (National): AU CA FI HU JP KR NO US

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LU MC NL SE

FR 2676070 A1 31 C12N-015/29

ZA 9203083 A 34 C12N-000/00

AU 9217892 A C12N-015/81 Based on patent WO 9219751

EP 584166 A1 F C12N-015/81 Based on patent WO 9219751

Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE					
JP 6506602	W	C12N-015/67	Based on patent WO 9219751		
HU 67448	T	C12N-015/81	Based on patent WO 9219751		
AU 658630	B	C12N-015/11	Previous Publ. patent AU 9217892 Based on patent WO 9219751		
US 5646012	A	23 C12P-021/02	Cont of application WO 92FR375 Cont of application US 93140093		
EP 584166	B1 F	22 C12N-015/81	Based on patent WO 9219751		
Designated States (Regional): AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL PT SE					
DE 69224902	E	C12N-015/81	Based on patent EP 584166 Based on patent WO 9219751		
ES 2113948	T3	C12N-015/81	Based on patent EP 584166		
NZ 242543	A	C12N-015/12			
FI 9304806	A	C12N-000/00			
NO 9303654	A	C12N-000/00			

Abstract (Basic): EP 511912 A

New DNA sequences (A) contain all or part of a specified 2249 bp sequence reproduced in the specification or of its complementary strand, or of a deriv. of these. (A) has the activity of a transcriptional promoter. Also new are (1) recombinant DNA (A') contg. (A) and (2) recombinant cells contg. (A) or (A').

Pref., (A') contains 1 or more structural genes plus segments which cause secretion of expression products. Partic. (A') is part of an expression plasmid of the autonomous or integrating types.

USE/ADVANTAGE - (A) is a very efficient promoter in yeasts, esp. Kluyveromyces and is used to express recombinant genes partic. simultaneous expression in 2 opposite orientations. These genes are esp. those of pharmaceutical or nutritional interest, esp. that for human serum albumin (HSA) (

Dwg. 0/14

Title Terms: STRONG; TRANSCRIBING; PROMOTE; KLUYVEROMYCES; LACTIS; EFFICIENCY; EXPRESS; HETEROLOGOUS; PROTEIN; HUMAN; SERUM; ALBUMIN; YEAST

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-000/00; C12N-015/11; C12N-015/12; C12N-015/29; C12N-015/67; C12N-015/81; C12P-021/02

International Patent Class (Additional): C07H-021/04; C07K-019/765; C12N-001/16; C12N-001/19; C12N-015/14; C12N-015/66

File Segment: CPI



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



⑪ Numéro de publication : 0 511 912 A1

⑫

## DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt : 92401206.5

⑮ Int. Cl.<sup>6</sup> : C12N 15/81, C12N 1/19,  
C12P 21/02

⑭ Date de dépôt : 28.04.92

⑯ Priorité : 30.04.91 FR 9105294

⑰ Inventeur : Fleer, Reinhard  
1 Allée Port Royal, Résidence de l'Abbaye  
F-91190 Gif Sur Yvette (FR)  
Inventeur : Fournier, Alain  
28 Avenue Roger Salengro  
F-92000 Chatenay Malabry (FR)  
Inventeur : Mayaux, Jean-François  
21 ter Boulevard de la République  
F-92260 Fontenay aux Rosee (FR)  
Inventeur : Yeh, Patrice  
11bis, rue Lacépède  
F-75005 Paris (FR)

⑯ Date de publication de la demande :  
04.11.92 Bulletin 92/45

⑰ Mendetaire : Savine, Jacqueline et al  
Rhône-Poulenc Rorer S.A. Direction Brevets  
(144) 20 avenue Raymond Aron  
F-92165 Antony Cédex (FR)

⑯ Etats contractants désignés :  
PT

⑰ Demandeur : RHONE-POULENC RORER SA  
20, avenue Raymond Aron  
F-92160 Antony (FR)

⑯ Promoteur de levure et son utilisation.

⑰ L'invention concerne des séquences d'ADN comprenant tout ou partie du promoteur du gène PGK de *K.lactis*, ou d'un dérivé de celui-ci, et possèdent une activité de promoteur transcriptionnel. Elle concerne également l'utilisation de ces séquences pour l'expression de gènes recombinés.

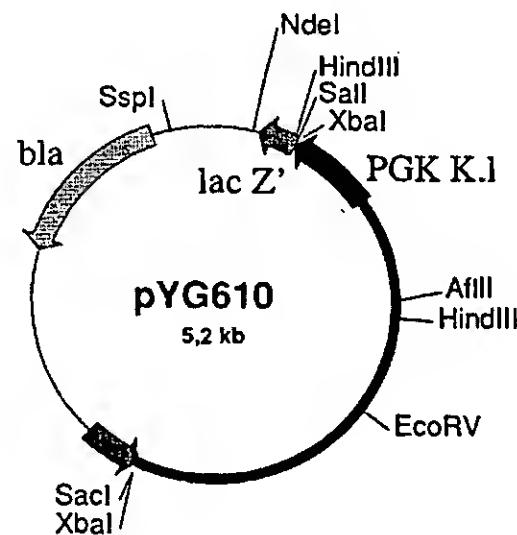


FIGURE 3

EP 0 511 912 A1

Le présente invention concerne le domaine de la biologie moléculaire. Plus particulièrement, elle concerne une nouvelle séquence d'ADN présentant une activité de promoteur transcriptionnel, des vecteurs d'expression contenant cette séquence, et son utilisation pour la production de protéines, et par exemple de protéines hétérologues. L'invention concerne aussi les cellules recombinées contenant cette séquence d'ADN.

Les progrès accomplis dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis de modifier des microorganismes pour leur faire produire des protéines hétérologues. En particulier, de nombreuses études génétiques ont porté sur la bactérie *E. coli*. Toutefois, l'application Industrielle de ces nouveaux modes de production est encore limitée, en particulier par les problèmes d'efficacité d'expression des gènes dans ces microorganismes recombinés. Aussi, dans le but d'augmenter les performances de ces systèmes de production, des recherches ont été effectuées afin d'isoler des promoteurs forts, permettant d'obtenir des niveaux élevés d'expression de protéines hétérologues. Chez *E. coli*, on peut citer en particulier les promoteurs des opérons tryptophane et lactose.

Plus récemment, chez le levure *S. cerevisiae*, des études ont porté sur des promoteurs dérivés de gènes impliqués dans la glycolyse. On peut citer notamment les travaux sur le promoteur du gène de la 3-phosphoglycerate kinase PGK (Dobson et al., Nucleic Acid Res. 10, 1982, 2625 ; Hitzeman et al., Nucleic Acid Research 1982, 7791), sur celui du gène de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase GAPDH (Holland et al., J.Biol.Chem. 254, 1979, 9839 ; Musti et al., Gene 25, 1983, 133), sur celui du gène de l'alcool déshydrogénase 1 ADH1 (Bennetzen et al., J.Biol.Chem. 257, 1982, 3018 ; Denis et al., J.Biol.Chem. 25, 1983, 1165), ou sur celui du gène de l'énatase 1 ENO1 (Uemura et al., Gene 45, 1986, 65).

Récemment, des outils génétiques ont été développés afin de se servir de la levure *Kluyveromyces* comme cellule hôte pour la production de protéines recombinantes. La mise en évidence d'un plasmide de type 2-micron originale de *K. drosophilae* (plasmide pKD1 - EP 241 435) a permis d'établir un système hôte/vecteur très efficace pour la production de protéines recombinantes (EP 361 991). Cependant, les promoteurs utilisés dans ce système n'ont jamais été optimisés. En particulier, il s'agit essentiellement de promoteurs hétérologues, c'est-à-dire provenant d'autres microorganismes, tel que notamment *S. cerevisiae*. Cette situation peut engendrer différents inconvénients, et notamment limiter l'activité du promoteur à cause de l'absence de certains éléments de la machinerie transcriptionnelle (par exemple de trans-activateurs), présenter une certaine toxicité pour la cellule hôte due à une absence de régulation, ou affecter la stabilité du vecteur.

Dans ces conditions, le manque de promoteurs homologues forts chez *Kluyveromyces* constitue un facteur limitant dans l'exploitation Industrielle de ce système d'expression.

5 La Demanderesse a maintenant identifié, cloné et séquencé une région du génome de *Kluyveromyces lactis* présentant une activité de promoteur transcriptionnel (voir figure 1). Plus précisément, cette région correspond au promoteur du gène PGK de *K.lactis*.

10 Cette région, ou des dérivés ou fragments de celle-ci, peut être utilisée de manière très performante pour le production de protéines recombinantes chez les levures du genre *Kluyveromyces*. Il est entendu que cette séquence peut également être utilisée dans d'autres organismes hôtes.

15 Per ailleurs, l'analyse de la région du génome de *Kluyveromyces* obtenue a permis de mettre en évidence 2 phases de lecture dans les 2 orientations opposées (voir figure 2). Cette observation indique que le brin complémentaire de la région présentée sur la figure 1 possède également une activité promotrice agissant dans l'autre orientation.

20 Un objet de la présente invention réside donc dans une séquence d'ADN comprenant tout ou partie de la séquence présentée à la figure 1 ou de son brin complémentaire, ou d'un dérivé de celles-ci, et possédant une activité de promoteur.

25 Au sens de la présente Invention, on entend par dérivé, toute séquence obtenue à partir de la séquence donnée dans la figure 1 par modifications structurales (mutations, délétions, substitutions, additions, fragmentations ...) conservant une activité de promoteur. En particulier, les mutations peuvent porter sur un ou plusieurs nucléotides, et les additions et/ou substitutions peuvent porter sur des éléments de régulation, ou des régions activatrices telles que les "UAS".

30 Lorsqu'un dérivé est réalisé, son activité de promoteur transcriptionnel peut être mise en évidence de plusieurs façons, et en particulier en plaçant sous le contrôle de la séquence étudiée, un gène de résistance ou un marqueur de complémentation. Toute autre technique connue de l'homme de l'art peut bien évidemment être utilisée à cet effet.

35 Un objet plus particulier de l'invention concerne une séquence d'ADN correspondant à la région comprise entre les 2 phases ouvertes ORF PGK et ORF X, telle que présentée sur la figure 6.

40 Un autre objet de l'invention concerne un ADN recombinant comprenant une séquence d'ADN telle que définie ci-dessus.

45 Cet ADN recombinant peut contenir par exemple la séquence promotrice présentée à la figure 1 ou un dérivé de celle-ci, dans laquelle est inséré un site de restriction, facilitant l'utilisation de cette séquence comme promoteur, "portable".

50 Préférentiellement, cet ADN recombinant contient en outre un ou plusieurs gènes de structure.

Encore plus préférentiellement, l'ADN recombinant contient également des signaux permettant la sécrétion du produit d'expression du ou desdits gènes de structure.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'ADN recombinant fait partie d'un plasmide d'expression, qui peut être à réplication autonome ou intégratif.

En particulier, des vecteurs à réplication autonome peuvent être obtenus en utilisant des séquences à réplication autonomes (ARS) chez l'hôte choisi. Notamment, chez la levure, il peut s'agir d'origines de réplication dérivées de plasmides connus (pKD1, 2 $\mu$ , etc.).

Les vecteurs intégratifs peuvent être obtenus notamment en utilisant des séquences homologues à certaines régions du génome de l'hôte, permettant, par recombinaison homologue, l'intégration du vecteur.

Le séquence présentée sur la figure 1 a été obtenue par criblage d'une banque d'ADN génomique total de Kluyveromyces lactis au moyen d'une sonde hétérologue provenant du gène PGK de S. cerevisiae. La Demandante a en effet montré qu'il est possible de cloner une région promotrice chez Kluyveromyces, par hybridation à partir de sondes hétérologues correspondant à un gène de S. cerevisiae. Les détails du clonage de la séquence sont donnés dans les exemples. La région Intergénique peut ensuite être isolée à partir de cette séquence, notamment par insertion de sites de restriction en utilisant la technique d'amplification par PCR comme indiqué dans les exemples.

Un autre objet de l'invention concerne les cellules recombinées contenant une séquence d'ADN telle que définie ci-avant.

Avantageusement, les cellules sont choisies parmi les levures, et encore plus préférentiellement, parmi les levures du genre Kluyveromyces. Il est entendu cependant que l'invention couvre toute les cellules recombinées dans lesquelles les régions promotrices de l'invention sont actives.

Ces cellules peuvent être obtenues par toute méthode permettant d'introduire un ADN étranger dans une cellule. Il peut s'agir notamment de transformation, électroporation, ou toute autre technique connue de l'homme de l'art.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'une séquence telle que précédemment définie pour l'expression de gènes recombinés.

Comme l'illustrent les exemples, les séquences d'ADN selon l'invention permettent en effet une production à des niveaux élevés de protéines recombinantes.

Par ailleurs, l'activité promotrice bidirectionnelle des séquences de l'invention permet une utilisation particulièrement avantageuse. Notamment, il est possible d'utiliser ces séquences dans les 2 orientations

possibles, pour l'expression simultanée de plusieurs gènes de structure.

Avantageusement, l'invention concerne l'utilisation d'une séquence telle que précédemment définie pour l'expression simultanée, dans les 2 orientations opposées, de gènes recombinés.

Avantageusement, les séquences de l'invention peuvent être utilisées pour l'expression de gènes codant pour des protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire. A titre d'exemple, on peut citer les enzymes (tels que notamment le superoxyde dismutase, la catalase, les amylases, les lipases, les émides, la chymosine etc.), les dérivés sanguins (tels que la sérum-albumine, l'alpha- ou la bêta-globine, le facteur VIII, le facteur IX, le facteur van Willebrend, la fibronectine, l'alpha-1 entitypsine etc.), l'insuline et ses variants, les lymphokines (telles que les interleukines, les interférons, les facteurs de stimulation des colonies (G-CSF, GM-CSF, M-CSF...), le TNF, le TRF etc.), les facteurs de croissance (tels que l'hormone de croissance, l'érythropoïétine, le FGF, l'EGF, la PDGF, le TGF etc.), les epolipoprotéines, des polypeptides antigéniques pour la réalisation de vaccins (hépatite, cytomégalovirus, Eppstein-Barr, herpes etc.), ou encore des fusions de polypeptides telles que notamment des fusions comportant une partie active fusionnée à une partie stabilisatrice (par exemple des fusions entre l'albumine ou des fragments d'albumine et le récepteur ou une partie d'un récepteur de virus (CD4, etc.).

L'invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent, qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### 35 LEGENDE DES FIGURES

Figure 1 : Séquence nucléotidique de la région de 2,2 kb du fragment chromosomique situé en amont du codon d'initiation de la traduction du gène PGK de K.lactis possédant l'activité promotrice.

Figure 2 : Analyse des phases ouvertes de lecture. Les demi-trait verticaux représentent des codons d'initiation de la traduction. Les traits verticaux entiers représentent des codons stop. Les régions claires mettent en évidence les phases ouvertes de lecture (ORF X et ORF PGK).

Figure 3 : Carte de restriction du plasmide pYG610. La région noire correspond à la région isolée du génome de K.lactis.

Figure 4 : Stratégie de séquençage du fragment Xba de 2,5 kb.

Figure 5 : Séquence et localisation des oligo-déoxynucléotides utilisés dans la réaction de PCR, pour l'insertion d'un site HindIII en -8 de l'ATG de la séquence de la figure 1. Les oligo-déoxynucléotides sont représentés en italique. L'ATG correspond au codon d'initiation de la tra-

duction du gène PGK.

**Figure 6 :** Séquence nucléotidique de la région intergénique du fragment 2,2 kb. 6(a) : oligodéoxy-nucléotides utilisés dans la réaction de PCR. 6(b) : Fragment Sal(I)-HindIII correspondant aux nucléotides 1343 à 2246 sur la séquence de la figure 1.

**Figure 7:** Stratégie de construction du plasmide pYG45.

**Figure 8:** Stratégie de construction de cassettes d'expression de la sérum-albumine humaine.

**Figure 9:** Stratégie de construction du plasmide pYG65.

**Figure 10:** Stratégie de construction du plasmide pYG70.

**Figure 11:** Stratégie de construction du plasmide pYG72.

**Figure 12:** Stratégie de construction du vecteur pYG621.

**Figure 13 :** Mise en évidence par "Northern blot" de l'expression du gène de l'albumine humaine sous la dépendance du promoteur PGK de *K.lactis*. Les échantillons correspondent à 10 µg d'ARN total. 18S et 28S sont les positions des ARN ribosomiques 18S et 28S. ALB = fragments reconnus par la sonde correspondant au gène de l'albumine; URA = fragments reconnus par la sonde correspondant au gène URA A de *K.lactis* servant de témoin de dépôt.

**Figure 14 :** Mise en évidence de la production d'albumine dans les souches transformées par le vecteur d'expression pYG621 contenant le promoteur PGK de *K.lactis*. Les échantillons correspondent à 30 µl de suageant de culture ; les bandes au niveau du marqueur 66 kd correspondent à l'albumine. M = marqueurs de massa moléculaire : anhydrase carbonique bovine (31Kd), ovalbumine (45Kd), BSA (66Kd), phosphorylase b de lapin (92Kd).

## EXEMPLES

### 1/ Isolement de la région promotrice du gène PGK de *K.lactis*.

La séquence présentée sur la figure 1 a été obtenue par criblage d'une banque d'ADN génomique total de *Kluyveromyces lactis* CBS2359 au moyen d'une sonde hétérologue provenant du gène PGK de *S. cerevisiae* (Dobson et al., Nucleic Acid Res. 1982, 10, 2625). Plus précisément, la sonde utilisée correspond au fragment N-terminal PvuI-EcoRI de 1,3 kb du gène PGK de *S. cerevisiae*.

En "Southern blot" (Southern et al., J.Biol.Chem., 1975, 98, 503), la sonde utilisée s'hybride avec deux fragments différents lorsque l'ADN génomique est digéré par XbaI. L'un d'eux, de 2,5 kb environ, a été isolé par criblage d'une banque génomique restreinte de

*K. lactis* CBS2359, constituée de fragments d'ADN coupés par XbaI, d'une taille comprise entre 2 et 3 kb, introduits dans le plasmide pUC18 au site XbaI. Une banque de 500 clones a ainsi été constituée, puis criblée avec la sonde hétérologue décrite ci-dessus.

5 Par hybridation sur colonies, un clone a pu être identifié et son ADN plasmidique a été préparé. Ce plasmide (pYG610) contient un fragment d'ADN génomique de 2,5 kb, dont la carte de restriction est présentée à la figure 3. Le plasmide pYG611 contient le même insert dans la direction opposée (voir figura 8).

10 Dans une seconde étape, le fragment de 2,5 kb ainsi isolé a été séquencé, en utilisant la méthode de Sanger (Sanger et al., Proc.Nat.Acad.Sci 74, 1977, 5463). Pour cela, le fragment issu de pYG611 a d'abord été sous-cloné dans les bactériophages M13<sub>g</sub>130 et M13<sub>tg</sub>131. La stratégie de séquençage du fragment est schématisée sur la figura 4.

15 L'analyse de la séquence obtenue montre que le fragment isolé contient une partie codant pour le régiion N-terminale de la protéine Pgk de *Kluyveromyces lactis* (0,3 kb), et 2,2 kb correspondent à la région promotrice située en amont du site d'initiation de la traduction. Elle montre de plus que, dans l'orientation opposée par rapport au gène PGK, sa situe une seconde phas de lecture située à environ 0,9 kb en amont de l'ATG du gène PGK (figura 2).

20 La comparaison de cette séquence avec celle du promoteur du gène PGK de *S. cerevisiae* fait apparaître l'absence d'homologie particulière, notamment avec son élément de régulation. Cette séquence correspond donc à une région promotrice entièrement originale, très distincte de celles déjà décrites, sur le plan de sa structure, et par conséquent sur le plan de sa régulation.

### 2/ Construction de vecteurs d'expression pour la production de protéines hétérologues :

30 40 Cet exemple illustre l'utilisation des capacités promotrices de la séquence de 2,2 kb de la séquence de la figure 1 et de séquences dérivées.

#### a) Insertion d'un site de restriction en -6 de l'ATG.

45 50 L'insertion de ce site permet ensuite d'introduire en aval du promoteur obtenu tout gène que l'on désire exprimer. Pour des raisons de compatibilité avec des vecteurs d'expression existant (EP 361 991), des promoteurs "portables" ont été construits sous forme de fragments SalI-HindIII.

55 55 Un site HindIII a été introduit en position -6 par rapport au site d'initiation de la traduction (ATG) du gène PGK en utilisant la technique d'amplification par PCR (Mullis et al., Meth.Enzymol. 155, 1987, 335). Dans ce but, 2 oligodéoxynucléotides ont été utilisés, qui sont présentés sur la figure 5.

L'oligodéoxynucléotide A correspond à la sé-

quence située à 467 pb en amont du codon ATG, au niveau d'un site HindIII, qui sera ainsi remplacé par un site Sall lors de l'amplification. L'oligodéoxynucléotide B correspond à la séquence en amont du site d'initiation, et permet d'introduire un site HindIII en position -6.

Le fragment obtenu par PCR a été inséré entre les sites Sall et HindIII du bactériophage M13tg130 afin de vérifier par séquençage que des mutations ne sont pas apparues lors de l'amplification.

b) Construction de cassettes d'expression de la sérum-albumine humaine : figure 8.

L'ADN recombinant de 474 pb obtenu ci-dessus a été introduit au niveau des sites Sall et HindIII, dans le plasmide pYG45 (figure 7) pour obtenir le vecteur pYG614 (figure 8). Le plasmide pYG45 contient une cassette d'expression constituée du promoteur et du terminateur du gène PGK de S. cerevisiae entre lesquels, au niveau d'un site HindIII, est inséré le gène codant pour le prépro-sérum-albumine humaine (séquence prépro-HSA). pYG45 est dérivé de pYG18 (voir brevet EP 361 991) par sous-clonage du fragment Sall-BamHI contenant la cassette d'expression HSA, dans les sites correspondants du vecteur pIC-20RDH (figure 7). pIC-20RDH est obtenu par digestion du plasmide pIC-20R (March et al., Gene 32, 1984, 481) avec l'enzyme HindIII, remplissage des extrémités avec le fragment Klenow de la polymérase I d'E.coli et recirculerisation avec le T4 DNA ligase.

A partir du plasmide pYG614, le fragment Sall-SacI peut être isolé par digestion. Il contient : une région promotrice dérivée de la séquence de la figure 1, le gène de l'albumine et le terminateur du gène PGK de S. cerevisiae. Il constitue une cassette d'expression qui peut être insérée dans un plasmide pour constituer un vecteur d'expression.

Une autre cassette d'expression peut être obtenue à partir du plasmide pYG614, par clonage du fragment AfIII-SacI contenant une partie du promoteur PGK de l'invention, le gène de l'albumine (prépro-HSA) et le terminateur PGK de S. cerevisiae dans le plasmide pYG611 décrit préalablement. Ceci génère le plasmide pYG615. Le fragment Sall-SacI contient : la région promotrice de la figure 1 entière, le gène codant pour la prépro-sérum-albumine, et le terminateur du gène PGK de S. cerevisiae, peut ensuite être isolé par digestion. Ce fragment constitue une seconde cassette d'expression de l'albumine utilisant la séquence promotrice de l'invention.

c) Construction de vecteurs d'expression de l'albumine.

Des vecteurs d'expression de l'albumine peuvent être construits par insertion des cassettes d'expression obtenues ci-dessus dans des plasmides navet-

tes K.lactis/E.coli tels que pYG72 (figure 10). En particulier, un vecteur d'expression a été obtenu (vecteur pYG621) par insertion du fragment Sall-SacI de pYG615 contenant la cassette d'expression de l'albumine dans le vecteur pYG72 (voir figure 10). Ce vecteur correspond au plasmide pKan 707 (voir EP 361 991) dans lequel le fragment SacI contenant le gène URA3 a été éliminé, ainsi que le site unique HindIII présent dans le gène aph pour faciliter les constructions ultérieures. Le gène aph code pour l'aminoglycoside 3'-phosphotransférase (I) (Oke et al., J. Mol. Biol. 147, 1981, 217) et est utilisé comme marqueur de résistance au G418 chez la levure. Le fragment PstI du plasmide pKan707 contenant le gène aph a été sous-cloné dans le bactériophage M13mp7 pour donner le vecteur pYG64 (figure 9). Le site HindIII présent dans ce gène a été détruit par mutagénèse dirigée selon la méthode décrite par Taylor et al. (Nucleic Acid Res. 13, 1985, 8749). Le plasmide résultant a été appelé pYG65 (figure 9). L'oligodéoxynucléotide utilisé pour la mutagénèse avait la séquence 5'-GAA ATG CAT AAG CTC TTG CCA TTC TCA CCG -3' et transformait le triplet CTT codant pour l'acide aminé 185 (Leu) en CTC. Ce changement ne modifie pas la séquence protéique résultante. Pour construire le plasmide pYG72, la partie contenant le réplican bactérien du vecteur pKan707 a été isolée par digestion avec l'enzyme EcoRI et recirculerisation avec la T4 DNA ligase pour obtenir pYG69. Le fragment PstI présent dans ce dernier vecteur contenant le gène eph a été remplacé par le fragment équivalent muté provenant de pYG65. Cette construction a été appelée pYG70. La séquence de pKD1 de 4,7 kb comprise entre les sites EcoRI et SacI a été introduite dans ce dernier vecteur pour obtenir pYG72. Le vecteur pYG621 (figure 11) a été obtenu par insertion du fragment Sall-SacI contenant la cassette d'expression de l'albumine provenant de pYG615.

40 3/ Construction d'une cassette permettant d'utiliser la région promotrice dans les 2 orientations.

Cette construction a été obtenue par introduction d'un site Sall et d'un site HindIII de part et d'autre de la région comprise entre les 2 phases ouvertes de lecture identifiées sur la figure 2: ORF PGK et ORF X, soit au niveau des nucléotides 1343 et 2246 sur la figure 1.

Cette construction a été réalisée par la technique de PCR en utilisant d'une part l'oligodéoxynucléotide A qui introduit un site Sall en position -1 par rapport au site d'initiation de la traduction du gène PGK, et d'autre part l'oligodéoxynucléotide B qui introduit un site HindIII en position -1 par rapport au site d'initiation de la traduction du gène X (voir figure 6(a)). Ensuite, pour éliminer un site HindIII présent dans la région promotrice, 3 réactions de PCR ont été effectuées en utilisant à chaque étape le plasmide pYG610

comme matrice :

- les 2 premières, pour amplifier les régions de part et d'autre du site HindIII en utilisant les oligodéoxynucléotides A et B couplés respectivement eux oligodéoxynucléotides C et D (figure 6). Ces 2 derniers sont complémentaires et permettent d'introduire une mutation ponctuelle au niveau du site HindIII interne ;
- la dernière, en utilisant les 2 produits d'amplification précédents comme amorce, pour générer le fragment final contenant la région promotrice modifiée.

Cette région peut ensuite être introduite dans les vecteurs décrits dans l'exemple 2, et utilisée comme promoteur bidirectionnel.

#### 4/ Expression d'albumine

Le vecteur pYG621 a été introduit par transformation dans la souche K.lactis MW98-8C (CBS 579.88), en utilisant la technique éthylène glycol/diméthylsulfoxyde (Durrens et al., 1990, Curr. Genet. 18, 7). Cette souche dérive de la souche sauvage CBS2359 et présente le génotype : Met, uraA, LysA, argA, K+, cir. Les levures transformées sont sélectionnées pour le phénotype "G418-resistant" qui confère le plasmide pYG621 sur milieu YPD (extrait de levure 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l) contenant de la génétidine à 0,2 g/l. Des souches transformées par le plasmide pYG72 ne contenant pas de cassette d'expression ont été sélectionnées pour servir de témoin dans les tests de production. Par ailleurs, afin de comparer l'efficacité du promoteur PGK de K.lactis selon l'invention par rapport à celui de S.cerevisiae, des souches transformées par le vecteur pYG19 ont également été sélectionnées. Le vecteur pYG19 est analogue au vecteur pYG621, sauf que le gène de l'albumine est sous le contrôle du promoteur PGK de S.cerevisiae (EP 361 991).

##### a) Analyse des ARNm :

Les cellules sont cultivées à 28°C en milieu sélectif YPD (extrait de levure 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l) contenant de la génétidine à 0,2 g/l. Les ARN totaux sont extraits (Sherman et al., Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986, 143) et séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Suivant la méthode de "Northern blot" (Maniatis et al., 1982 Molecular cloning, Cold Spring Harbor, Laboratory Press), les ARN sont hybridés à une sonde correspondant au gène de structure de l'albumine (fragment HindIII-HindIII de 1,9 kb) provenant du vecteur pYG18 (figure 7). L'autoradiographie montre clairement une bande de 2,3 kb spécifique de l'albumine (figure 13). Par ailleurs, il apparaît clairement que le taux de transcription du gène de l'albumine est bien supérieur dans les souches contenant une ré-

gion promotrice de l'invention (pYG621), que dans celles contenant le promoteur PGK intact de S.cerevisiae (pYG19).

##### 5 b) Analyse des protéines :

Les cellules sont cultivées en erlenmeyers dans un milieu sélectif YPD (extrait de levure 10 g/l, peptone 20 g/l, glucose 20 g/l) contenant de la génétidine à 0,2 g/l à 28°C sous agitation. Après 96 heures de culture, 30 µl de suageant sont prélevés et mélangés à un volume équivalent de tampon Laemmli 2X (Laemmli, 1970, Nature 227, 680). Après chauffage à 96°C pendant 10 minutes, les protéines de l'échantillon sont ensuite séparées sur gel de polyacrylamide SDS 8,5 %. La production d'albumine est ensuite révélée par coloration du gel au bleu de coomassie, puis est évaluée pour les différents vecteurs utilisés. La figure 14 montre que les 4 clones obtenus séparément par transformation de la souche MW98-8C par le vecteur pYG621 sécrètent beaucoup plus d'albumine que ceux obtenus par transformation avec le vecteur pYG19.

Il est clair que la région promotrice de l'invention permet une excellente production d'albumine par la levure, supérieure à celle obtenue avec le promoteur PGK de S.cerevisiae. Cette région, ou des formes réduites ou dérivées de celle-ci, constituent un outil industriel important pour les systèmes de production microbiologiques, et plus particulièrement eucaryotes.

#### Revendications

- 35 1. Séquence d'ADN comprenant tout ou partie de la séquence présentée à la figure 1 ou de son brin complémentaire, ou d'un dérivé de celles-ci, et possédant une activité de promoteur transcriptionnel.
2. Séquence d'ADN selon la revendication 1 comprenant tout ou partie de la séquence présentée sur la figure 6(b).
- 45 3. ADN recombinant comprenant une séquence d'ADN selon les revendications 1 ou 2.
- 50 4. ADN recombinant selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il contient en outre un ou plusieurs gènes de structure.
- 55 5. ADN recombinant selon la revendication 4 caractérisé en ce qu'il contient également des signaux permettant la sécrétion du produit d'expression du ou desdits gènes de structure.
6. ADN recombinant selon l'une quelconque des re-

revendications 3 à 5 caractérisé en ce qu'il fait partie d'un plasmide d'expression, qui peut être à réplication autonome ou intégratif.

7. Cellule recombinée contenant une séquence d'ADN ou un ADN recombinant selon l'une quelconque des revendications précédentes. 5
8. Cellule recombinée selon la revendication 7 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure. 10
9. Cellule recombinée selon la revendication 8 caractérisée en ce qu'il s'agit d'une levure du genre Kluyveromyces. 15
10. Utilisation d'une séquence d'ADN selon l'une quelconque des revendications 1 à 6 pour l'expression de gènes recombinés.
11. Utilisation selon la revendication 10 pour l'expression simultanée, dans les 2 orientations opposées, de gènes recombinés. 20
12. Utilisation selon l'une des revendications 10 ou 11 pour l'expression de gènes codant pour des protéines d'intérêt pharmaceutique ou agroalimentaire. 25
13. Procédé de préparation d'une protéine recombinante par expression de son gène dans un hôte cellulaire caractérisé en ce que l'expression dudit gène est sous le contrôle d'une séquence selon la revendication 1. 30
14. Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que la protéine est la sérum-albumine humaine. 35

40

45

50

55

10 20 30 40 50 60  
 TCTAGATTTA GCGGGTCATC GAAATTTAGT AGCGAGTCTA TTAGGGACCA GAGTTGCAAC  
 70 80 90 100 110 120  
 CTGAGGTTTA ATGCGTCATC CTGTCGTGTC TTCAAGTTCC CCACATTGAAT CACTTGGACA  
 130 140 150 160 170 180  
 AACCGTTTCA TTGGTTTGAG GAAGGTGACG GATCTGGTA GAAACTGGAC TACTGCCATCT  
 190 200 210 220 230 240  
 GTTGGTAGTC TTGATGCCAT GGTGATGAGC CATTGCCATT GGAAAAGAGT GAATTCAAGAT  
 250 260 270 280 290 300  
 TCGAAGATTG GGTGAATGAT TGATTTGTA AGATTGAGAT CGTAATCCTG ATACTCTTG  
 310 320 330 340 350 360  
 AGCCATGTTT CCAACAGITC TTCGGAATCT GCCGGTGTGG AAACGAGTAT TTCCGGAGTAC  
 370 380 390 400 410 420  
 AATCTCGGTG GTTGCGTAT CTGAGAGGAT GGTGTAGTGG TTGATGTTG CTGTGTGAAA  
 430 440 450 460 470 480  
 GATGATGCAG AGCTGATCAA CGATTCGAAC TGGGAGATCA CTTCGTTCAC TTCTTCCTGG  
 490 500 510 520 530 540  
 TTCCCGTTAC CTGTTTGCCT TTCCCTCATAC ATTGGTACGC TATCCTCATC TTCAAGATAAC  
 550 560 570 580 590 600  
 GAAATATGAA ACTCATCGGA ATCGGACGCG TCGTTCAAAT CGCCCTCATC CTTGGTAATG  
 610 620 630 640 650 660  
 TTCTTGAAACC GGTGAGAAG GTTGAGAAC TCTGTCGGAA CACCACCCGTG CGGCGTATAC  
 670 680 690 700 710 720  
 CAGAACCAAGA ATAAATTGTA GCACATCTTA ACTTTCTCTA AGGAAACATC TGAACCTCTGA  
 730 740 750 760 770 780  
 TCAACGCATT CCGTAAGTAT ACTGTTGCC TTGTCTCTGG TGAATTATG AGGGTAAGAC  
 790 800 810 820 830 840  
 TCTGAGATCA TAAGTAAC TGAGGACATCG AAGTTGTTGT AGTTTGAAAT TAGGGATCTG  
 850 860 870 880 890 900  
 GAAAGATGCG GTACCACTGTC TTGATGACA TTATCTGGCG CGTTCAACGG TACGAATTCC  
 910 920 930 940 950 960  
 TGCAAGAATA GCGAATCCAA CGGTTTAAC TCAGAGTAAT GGTTGATCAA CTCGATGAAA  
 970 980 990 1000 1010 1020  
 ACGTCCGAAT GGATGGATTG CATCAAGTGT TGATGTTCCA CCAAATTAAAG ACAATATTTC  
 1030 1040 1050 1060 1070 1080  
 GTAACCGTTT CGAGTGAAAC TGACACGGGC CTGCCCTCAG CACTCGTAGA CACCGAGTAAC  
 1090 1100 1110 1120 1130 1140  
 GTCTTGAGAC CTCTCGTACA GGGAAAGCGAC ATATCGTCA ATAGACTATG GAACAAAGTG  
 1150 1160 1170 1180 1190 1200  
 TACACCGCAG CGATATCCTT GCATTTGCAA AACGATTGAA TAAGTGACGT CGATGCTAAA  
 1210 1220 1230 1240 1250 1260  
 TCCTGGATAA GTACCGCTGGT ATCGTGTAAAG CCCATGAGAA CGACACGTTTC CTCATCACTA

FIGURE 1

1270        1280        1290        1300        1310        1320  
 GAAGCCGAAC TGTGTCTTC AGTGGGGATT GGTCGACAT TTTGCCAATT GCTGTCGATG  
  
 1330        1340        1350        1360        1370        1380  
 TACCCCTTCA AAGCCATGTA CCTTAAATCT TCATCCTTGG CAAGTAGATT CATGGGTGT  
  
 1390        1400        1410        1420        1430        1440  
 GTTTGAAGTA AGAATATTG CTTGTTTTA TGGTATCAA GGTATATGTT GTAGAAGACA  
  
 1450        1460        1470        1480        1490        1500  
 ATTTCCGGTA ATCCAATTGT CTGTCTGTC AGTTAGCAC ATGTATAGTA CGTTGCACAT  
  
 1510        1520        1530        1540        1550        1560  
 AGTCTACAAT ATTCAAGCATT CAGCATTCA GATAACGAT ATGGCTAAAT GATCACAAAT  
  
 1570        1580        1590        1600        1610        1620  
 GTGATTGATG ATTTGACACG ACTAGAAAAG AGAACGAAAA AGGGAAATTC ATGTCACGTG  
  
 1630        1640        1650        1660        1670        1680  
 CGTTGGCACG TGACATGGAA TATCGAAGAA AGAAAAAAA AAACGATCTC GTCCTAGTGG  
  
 1690        1700        1710        1720        1730        1740  
 AAGCCCAGAG TCTGGTCCCC CCGGAGTCCT CCCAAACAA GAAGCTGACA CATGTTGACA  
  
 1750        1760        1770        1780        1790        1800  
 CAGAACACCC CACAGCAAAT GCACCAAGCT ACGTAGATCA GGAAGCTTAA CTCTAGCGAC  
  
 1810        1820        1830        1840        1850        1860  
 CTGTCGCTCG CCCCCACAGAA CCTCACCCGA GAACCACACA TTACACGCCG CCAGCTCCCA  
  
 1870        1880        1890        1900        1910        1920  
 CTATACTCAT CTTGCTTCCC TTAAGCGTTC TCACGATTG TTGCGCTGCC TTCTTCAGA  
  
 1930        1940        1950        1960        1970        1980  
 GTCTTCTGAT TCTAATTCTC ATTCAAAATC CTCTACAGTT AATGAATTGC TTGACATGAC  
  
 1990        2000        2010        2020        2030        2040  
 ATTCAATTGTC TCATGGTTT GGCTTTTGG CTTTGTCTT TTAAAGCTAT ATCAACTTTA  
  
 2050        2060        2070        2080        2090        2100  
 CATATAAAATA TACGTCAAAA GGGGATTCA TAATTAGAAA ATTCTCTTT TCAATAGTTG  
  
 2110        2120        2130        2140        2150        2160  
 CTATTCACTTA TCAATCTATT CAACTCAATT GGTTATTATT TTCACTTTT TGTCATCCTA  
  
 2170        2180        2190        2200        2210        2220  
 AACCATCAAC AATAATTAAA TATATCTGTT GCTACATTAA GAGTTACTTC AGAAATAACA  
  
 2230        2240        2250  
 AAAAAATCGA TCAAGAATTA ATAAAAA**ATG**  
 Met

FIGURE 1 (suite)

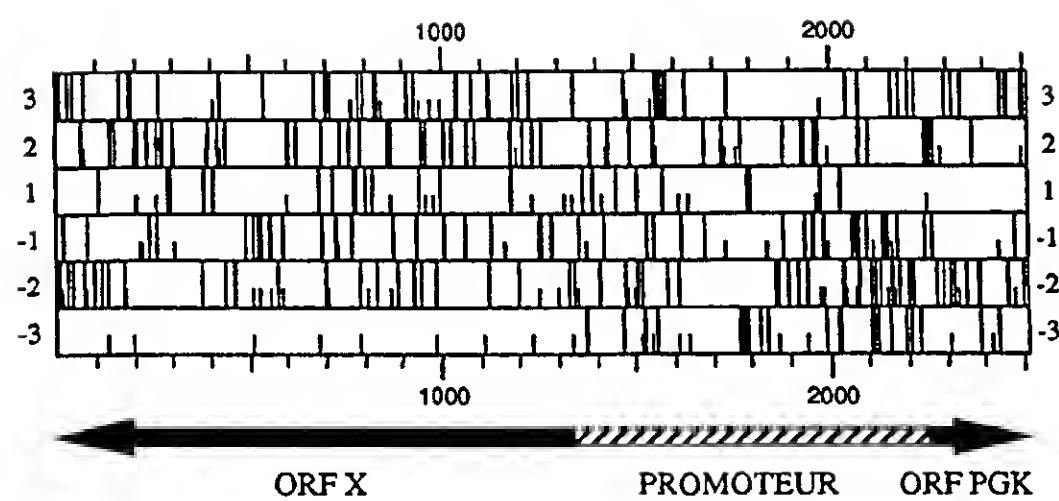


FIGURE 2

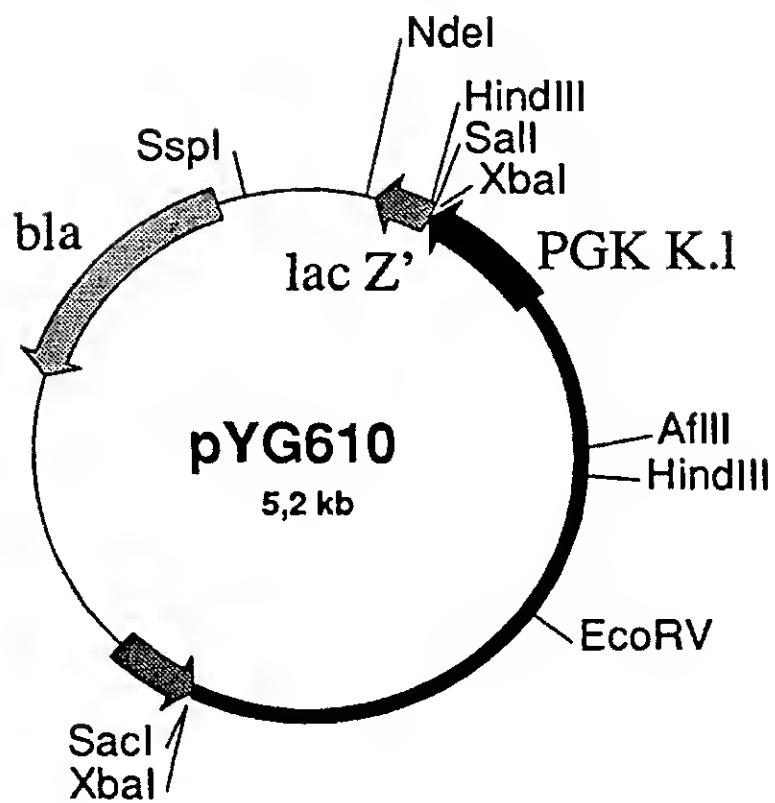


FIGURE 3

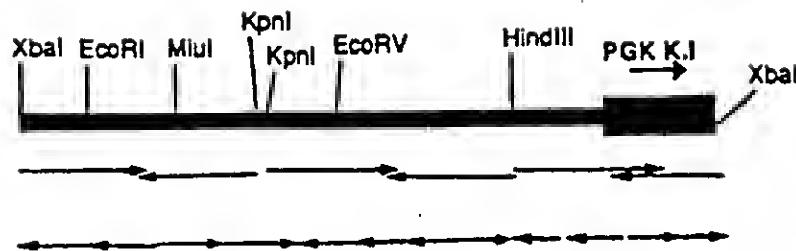


FIGURE 4

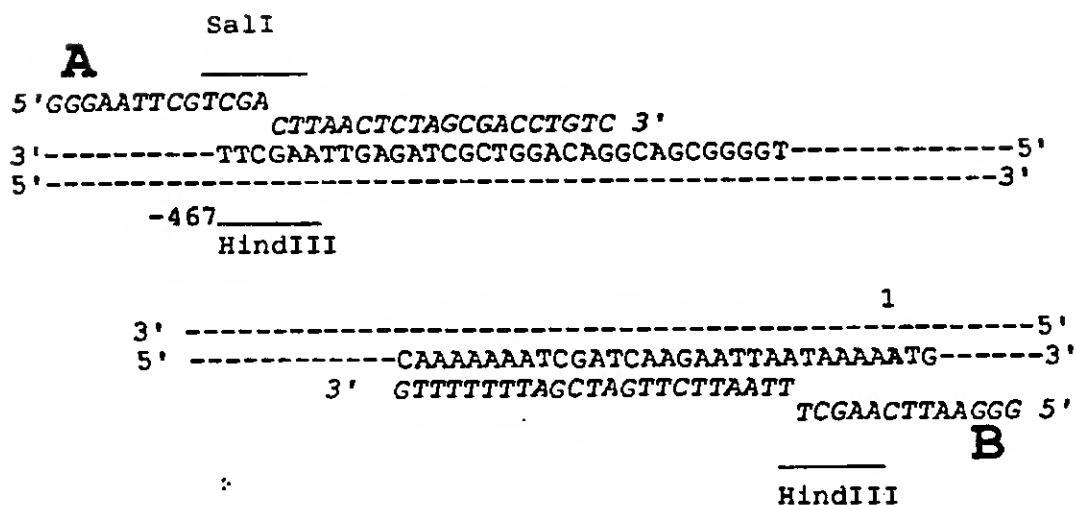


FIGURE 5

## Oligodésoxynucléotide A

5'CATGTCGACTTTTATTAATTCTTGATCGAT3'

Sall

## Oligodésoxynucléotide B

5'ATGAAGCTTAAATCTTCATCCTGGC3'

HindIII

## Oligodésoxynucléotide C

5'GGGTGAGGTTCTGTGGGGCGAGCGACAGGTCGCTAGAGTTAACGATCCTGATC3'

(Position: 439 à 492)

## Oligodésoxynucléotide D

5'GATCAGGATGCTTAACTCTAGCGACCTGTCGCTGCCAACAGAACCTCACCC3'

(Position: 439 à 492)

HindIII	10	20	30	40	50	60	
aagctt	TTAA	ATCTTCATCC	TTGGCAAGTA	GATTCACTGG	GTGTGTTGA	AGTAAGAATA	60
ttcgaa	AATT	TAGAAGTAGG	AACCCTTCAT	CTAAAGTAGCC	CACACAAACT	TCATTCTTAT	
TTGCTTGTT	TTTATGGTAT	CAAAGGTATA	TGTTGTAGAA	GACAATTTC	GGTAATCCAA	120	
AAACGAACAA	AAATACCATA	GTTCATAT	ACAACATCTT	CTGTTAAAGG	CCATTAGGTT		
TTGCTCTGCT	GCTCAGTTA	GCACATGTAT	AGTACGTTGC	ACATAGTCTA	CAATATTCA	180	
AACAGACAGA	CGAGTCAAAT	CGTGTACATA	TCATGCAACG	TGATCAGAT	GTTATAAGTC		
CATTCAGCAT	TCAGTATACA	GCATATGGCT	AAATGATCAC	AAATGTGATT	GATGATTGA	240	
GTAAGTCGTA	AGTCATATGT	CGTATACCGA	TTTACTAGTG	TTTACACTAA	CTACTAAACA		
CACGACTAGA	AAAGAGAACG	AAAAAGGGAA	ATTCACTGTCA	CGTGCCTTGG	CACGTGACAT	300	
GTGCTGATCT	TTTCTCTTGC	TTTTTCCCTT	TAAGTACAGT	GCACGCAACC	GTGCACTGTA		
GGAATATCGA	AGAAAGAAAA	AAAAAAACGA	TCTCGCTCTA	GTGGAGGCC	AGAGTCTGGT	360	
CCTTATAGCT	TCTTCTTTT	TTTTTTGCT	AGAGCAGGAT	CACCTTCGGG	TCTCAGACCA		
CCCCCCGGAG	TCTTCCAAA	ACAAGAACG	GACACATGTT	GACACAGAAC	ACCCCCACAGC	420	
GGGGGGCCTC	AGAAGGGTTT	TGTTCTTCGA	CTGTCACAA	CTGTCCTTG	TGGGGTGTG		
AAATGCACCA	CGCTACGTAG	ATCAGGATGC	TTAACTCTAG	CGACCTGTG	CTCGCCCCAC	480	
TTTACGTGGT	GCGATGCATC	TAGTCCTACG	AATTGAGATC	GCTGGACAGC	GAGCGGGGTG		
AGAACCTCAC	CCGAGAACCA	CACATTACAC	GCCGCCAGCT	CCCACTATAC	TCATCTGCT	540	
TCTTGGAGTG	GGCTCTGGT	GTTAATGTG	CGGCGGTGCA	GGGTGATATG	AGTAGAACGA		
TCCCTTAAGC	GTTCTCACGA	TTCGTTCGCT	GCCCTTCTTC	AAAGGTCTTC	TGATTCTAAT	600	
AGGGAATTG	CAAGAGTGCT	AAGCAAGCGA	CGGGAAGAAG	TTCTCAGAAC	ACTAAGATTA		
TCTCATTGCA	AATCCTCTAC	AGTTAATGAA	TTGCTTGACA	TGACATTCA	TGTCTCATGG	660	
AGAGTAAGCT	TTAGGAGATG	TCAATTACTT	AACGAACGT	ACTGTAAGTA	ACAGAGTACC		
TTTTGGCTTT	TTGGCTTTG	TCTTTAAAG	CTATATCAAC	TTTACATATA	AAATACGTC	720	
AAAACCGAAA	AACCAGAAAC	AGAAAATTTC	GATATAGTTG	AATGTATAT	TTATATGCAG		
AAAAGGGGAT	TCATTAATTA	AAAAATTCTC	TTTTCAATA	GTGCTATT	ATTATCAATC	780	
TTTCCCCTA	AGTAATTAA	CTTTAAGAG	AAAAAGTTAT	CAACGATAAG	TAATAGTTAG		
TATTCAACTC	AATTGGTTAT	TATTTCTAC	TTTTGTCA	CCTAAACCAT	CAACAAATT	840	
ATAAGTTGAG	TTAACCAATA	ATAAAAGTAG	AAAACAGTA	GGATTTGGTA	GTTGTATAA		
TAAATATATC	TGTTGCTACA	TTAAGAGTTA	CTTCAGAAAT	AAACAAAAAA	TCGATCAAGA	900	
ATTATATATG	ACAAACGATGT	AATTCTCAAT	GAAGTCTTA	TTGTTTTTT	AGCTAGTTCT		
ATTAATAAAA	<u>Agtcgac</u>					917	
TAATTATTTT	Tcagctg						

10 Sall 20

30

40

50

60

FIGURE 6

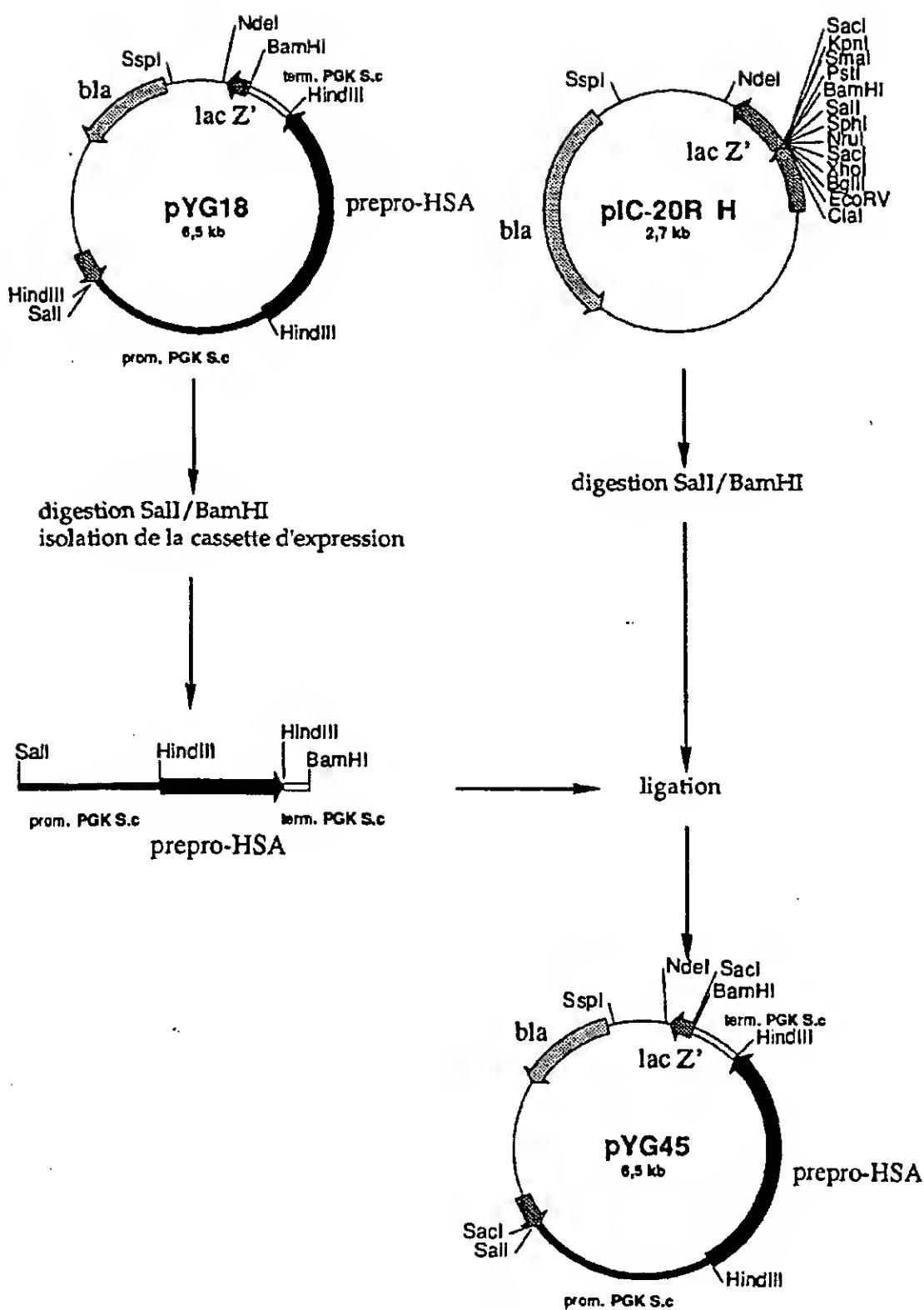


Figure 7

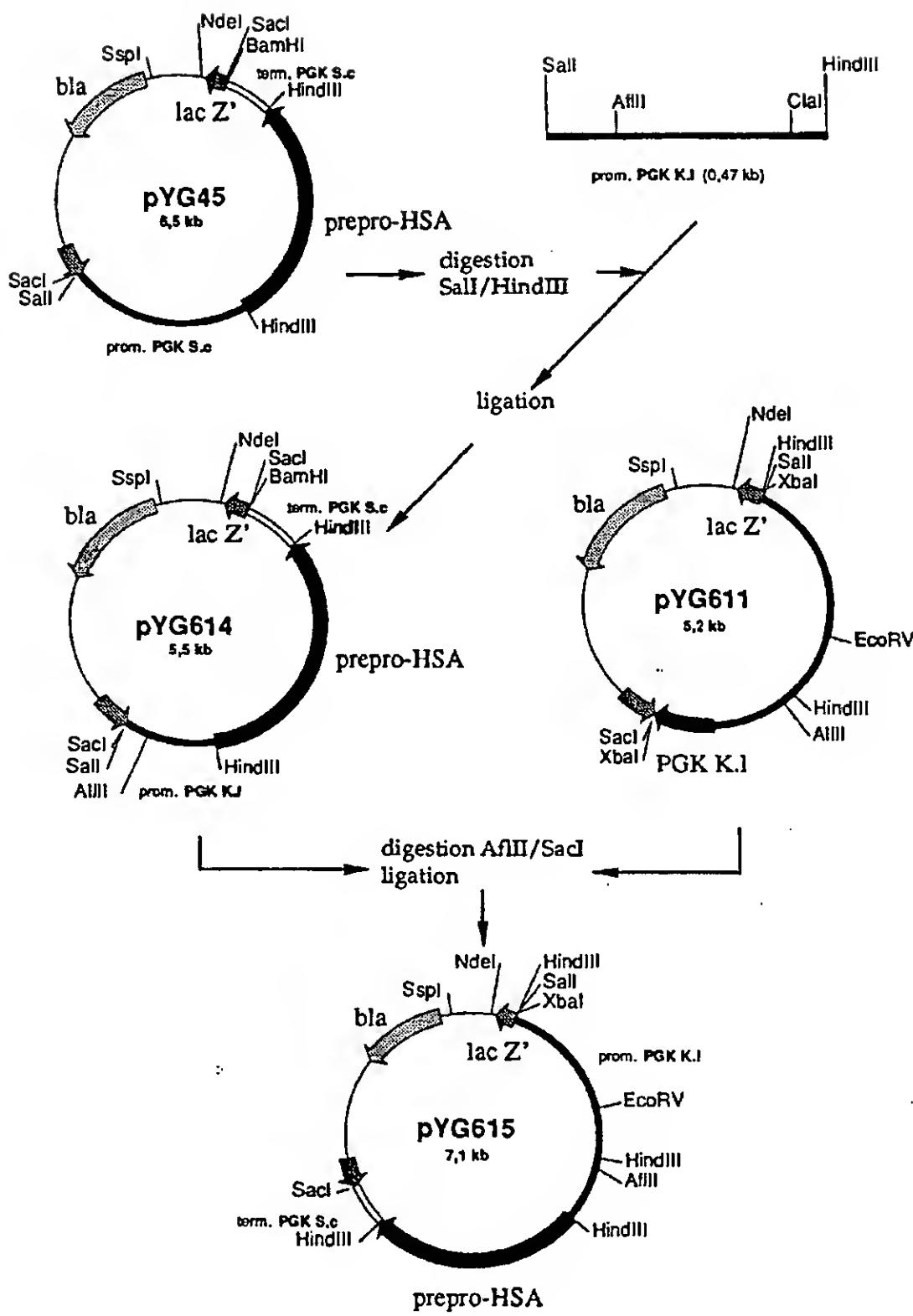


Figure 8

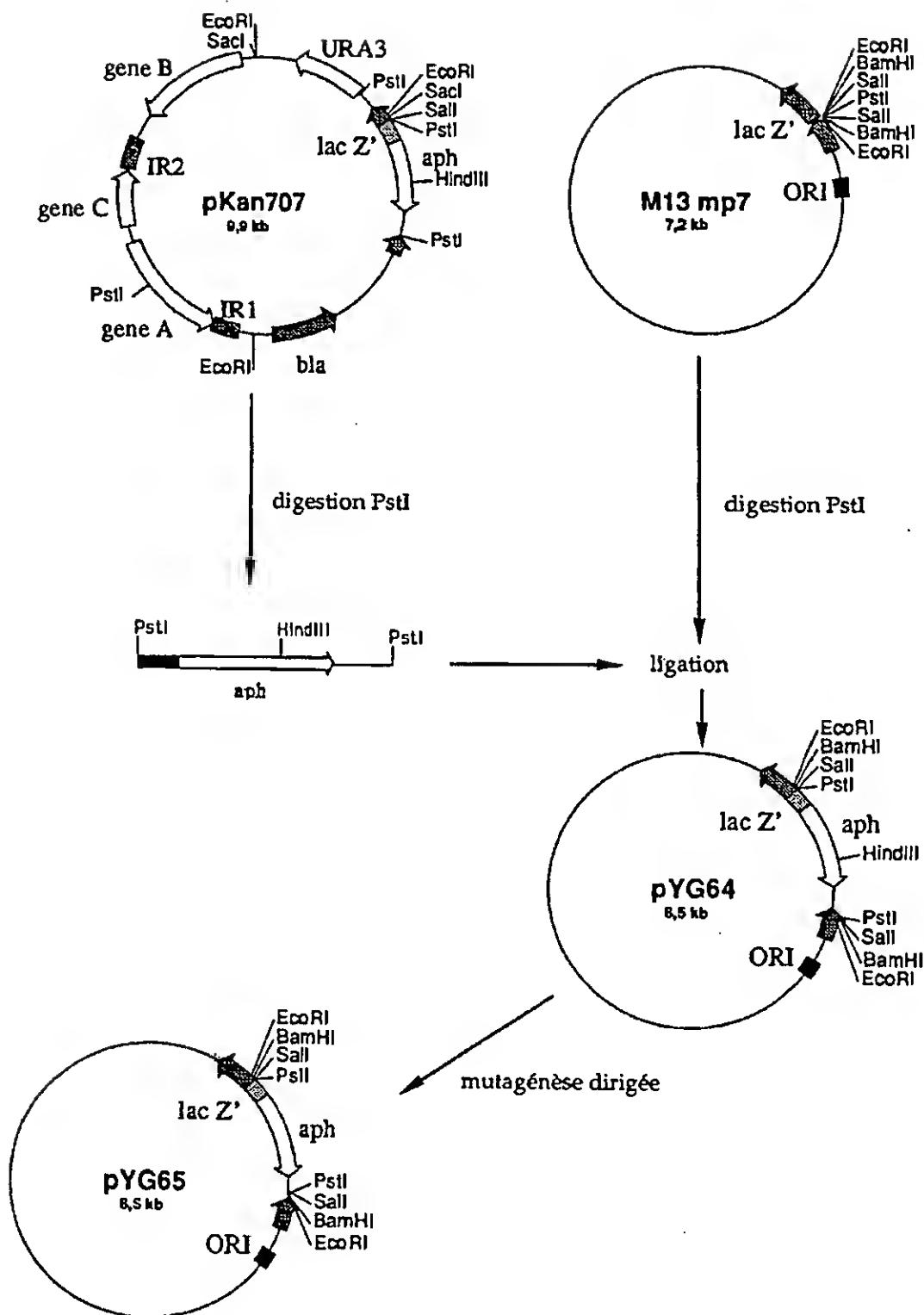


Figure 9

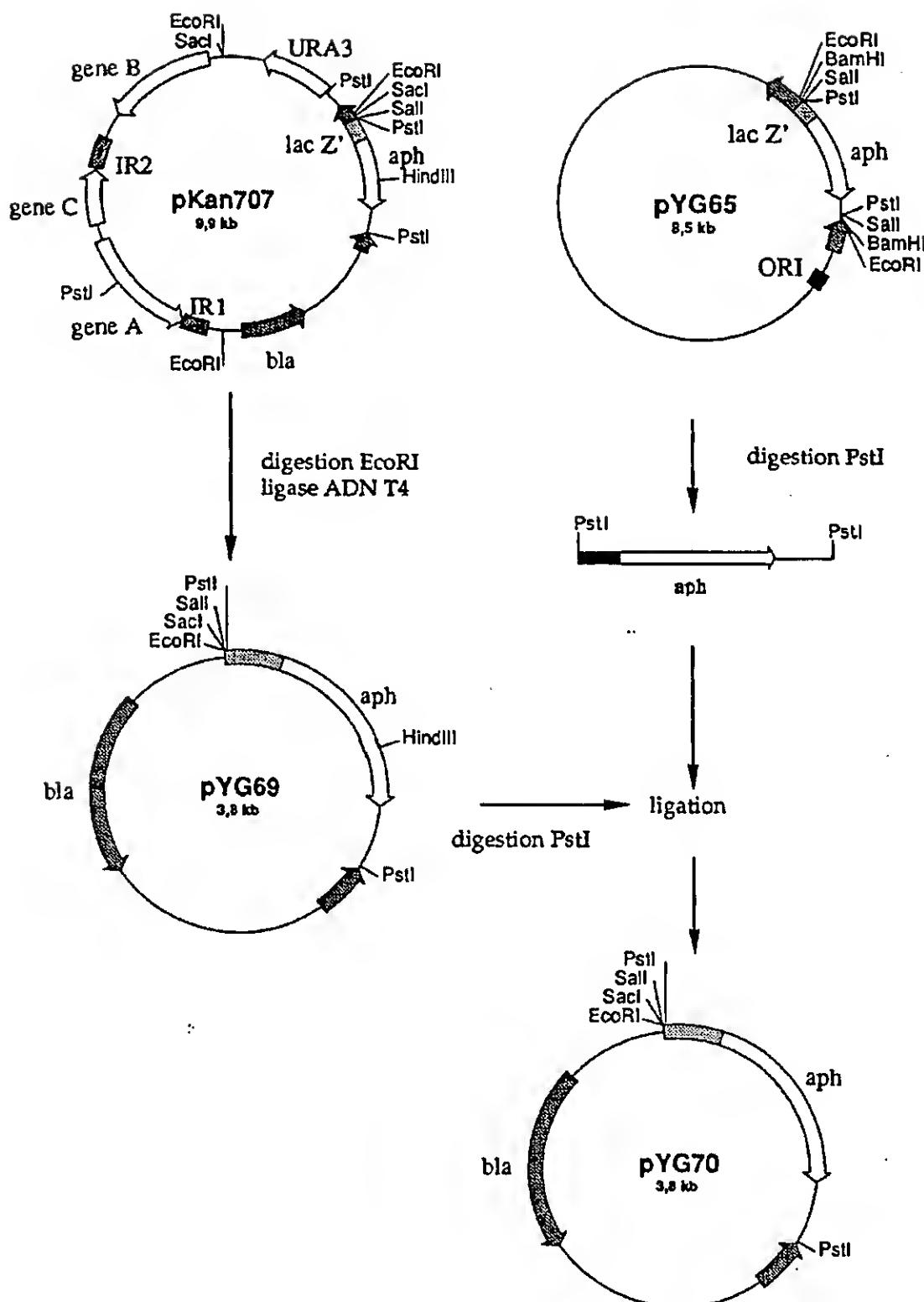


Figure 10

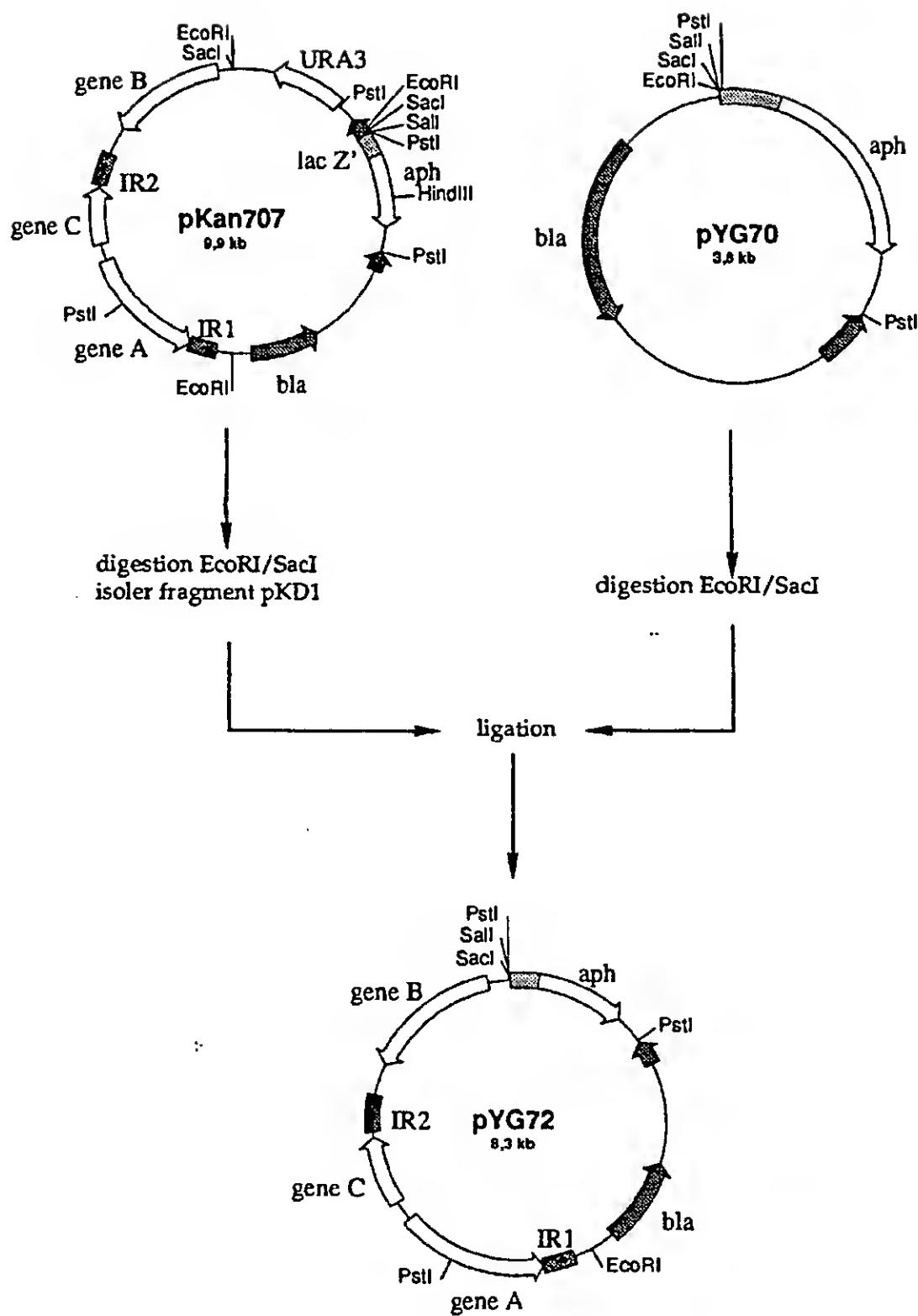


Figure 11

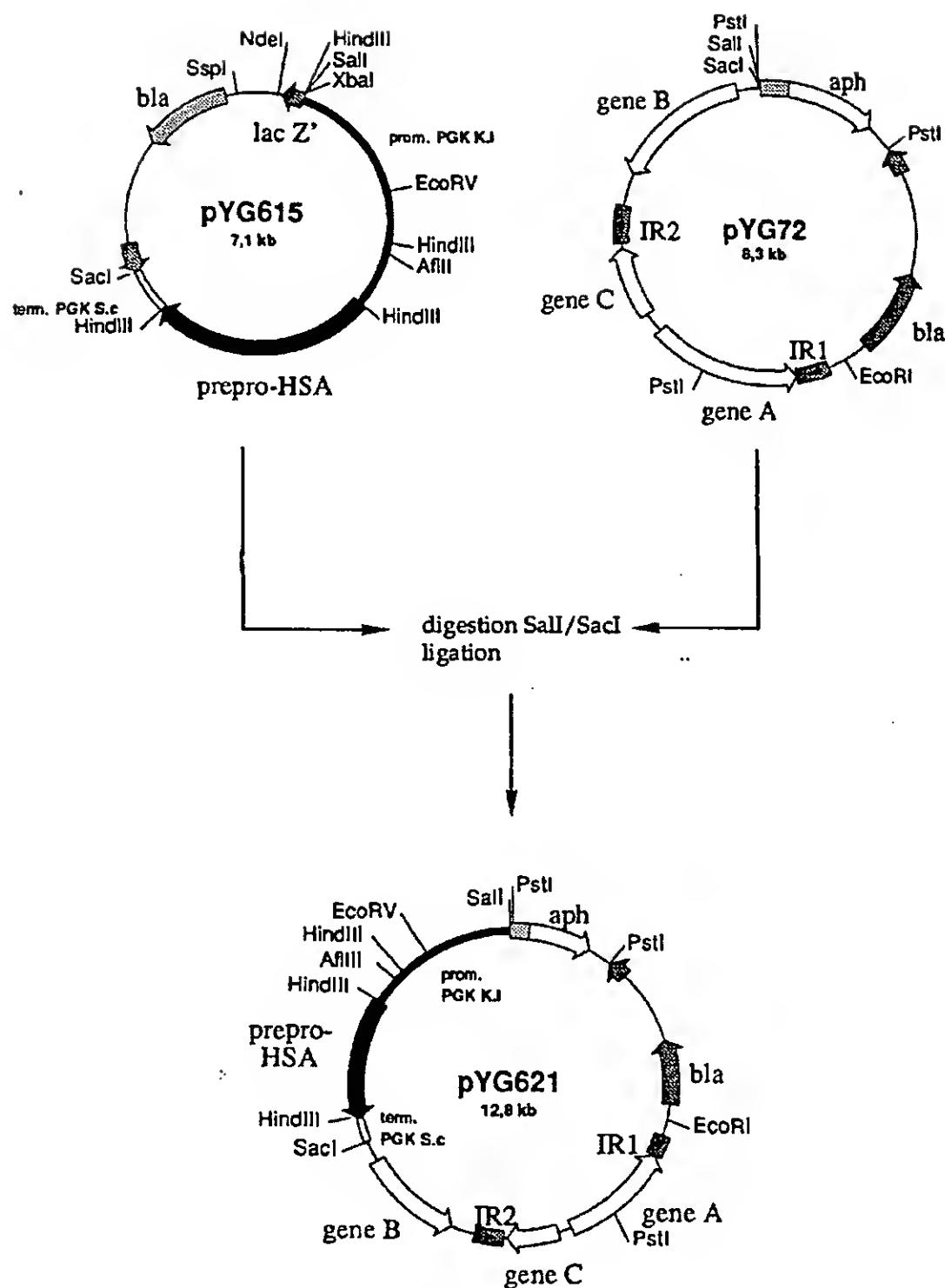


Figure 12

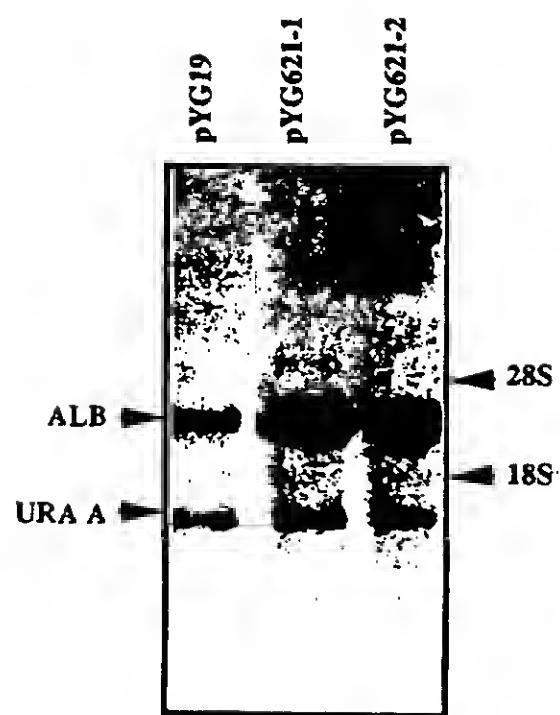


FIGURE 13

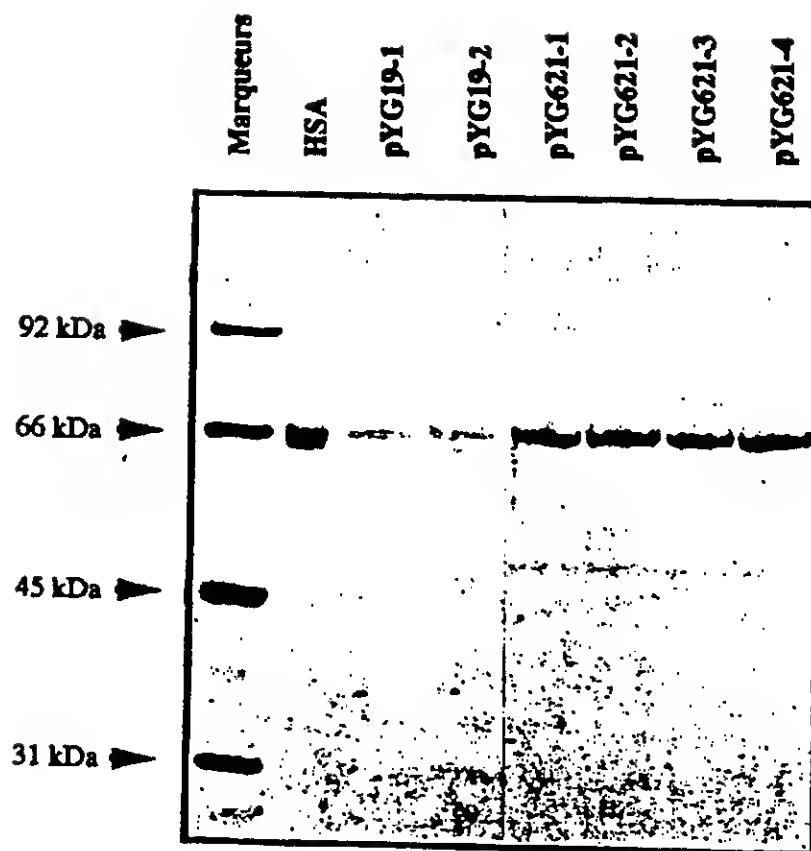


FIGURE 14



EP 92 40 1206

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			CLASSEMENT DE LA DEMANDE (int. CL.5)
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	
X	EP-A-0 361 991 (RHONE-POULENC SANTE) 4 Avril 1990 * revendications 13-16 * ---	1-12	C12N15/81 C12N1/19 C12P21/02
Y	NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 18, no. 2, 25 Janvier 1990, ARLINGTON, VIRGINIA US page 365; A. FOURNIER, R. FLEER, P. YEH AND J.-F. MAYAUX; 'The primary structure of the 3-phosphoglycerate kinase (PGK) gene from Kluyveromyces lactis' * le document en entier * ---	1-12	
Y	BIOTECHNOLOGY vol. 8, no. 2, Février 1990, NEW YORK US pages 135 - 139; J.A. VAN DEN BERG ET AL.: 'Kluyveromyces as a host for heterologous gene expression: expression and secretion of prochymosin' * page 135, colonne 2, ligne 21 - page 135, colonne 2, ligne 39; figure 1 * ---	1-12	
A	JOURNAL OF BASIC MICROBIOLOGY vol. 28, no. 4, 1988, BERLIN, GERMANY pages 211 - 220; X.J. CHEN ET AL.: 'A gene-cloning system for Kluyveromyces lactis and isolation of a chromosomal gene required for killer toxin production' * page 214, ligne 13 - page 214, ligne 32 * -----		C12N C12P
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (int. CL.5)
Lieu de la recherche LA HAYE		Date d'achèvement de la recherche 22 JUIN 1992	Documenteur VAN PUTTEN A.J.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrête-plus technologique O : divulga-tion non écrite P : document latéralaire			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.